

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Docket No. 11154US.GAS

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

DHL EXPRESS 545 5026 824

In the application of: Michael Knoblauch et al.
Serial Number: 10/605,104
Filing Date: 9/9/2003
Title: Forisomes, Method for Their Isolation, and Their Use as a
Molecular Working Machine

Commissioner for Patents
Alexandria, VA 22313-1450

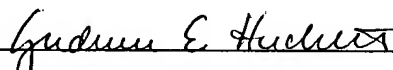
REQUEST TO GRANT PRIORITY DATE

Pursuant to 35 USC 119 and 37 CFR 1.55, applicant herewith claims priority of
the following **German** patent application(s):

10241681.8 filed 9/9/2002.

A certified copy of the priority document is enclosed.

Respectfully submitted February 4, 2004,



Ms. Gudrun E. Hockett, Ph.D.
Patent Agent, Reg. No. 35,747
Lönsstr. 53
42289 Wuppertal
GERMANY
Telephone: +49-202-257-0371
Telefax: +49-202-257-0372
gudrun.draudt@t-online.de

GEH/Enclosure: German priority document(s) 10241681.8



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 41 681.8

Anmeldetag: 09. September 2002

Anmelder/Inhaber: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung
der angewandten Forschung eV,
München/DE

Bezeichnung: Forisomen, Verfahren zu ihrer Isolierung und ihre
Verwendung als molekulare Arbeitsmaschine

IPC: C 07 K 7/06

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 11. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schus

Forisomen, Verfahren zu ihrer Isolierung und ihre Verwendung als molekulare Arbeitsmaschine

Die vorliegende Erfindung betrifft Forisomen, d.h.

5 Proteinkörper, die auch als kristalline P-Proteine bezeichnet werden und nach bisherigem Kenntnisstand ausschließlich, aber dort ubiquitär in Pflanzen aus der Familie der Fabaceen (Fabaceae, Papillionaceae) vorkommen. Diese Proteinkörper besitzen ganz außerordentliche, bisher nicht bekannte
10 Eigenschaften, die es ermöglichen, sie als molekulare Arbeitsmaschinen zu verwenden. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren, wie sich Forisomen aus ihrer natürlichen Umgebung isolieren lassen.

15 Das Phloem der höheren Pflanzen beinhaltet ein die Pflanze durchziehendes System von Mikrokanälen (Siebröhren), das dem Transport von Photoassimilaten dient (siehe Figur 2). Die Siebröhren bestehen aus Zellen, die im Verbund ein Kapillarsystem durch die gesamte Pflanze bilden, nämlich eben
20 dieses Phloem. Dabei handelt es sich um ein Mikrofluidiksystem mit bis zu 3,5 MPa Innendruck und maximalen Strömungsgeschwindigkeiten bis zu 3 cm/min⁻¹.

Kristalline P-Proteine sind spezifische Inhaltskörper der
25 Siebelemente der Leguminosen (Fabaceae). Sie wurden zunächst in Planzenschnitten beobachtet und als meist längliche, bis zu 30 µm große, kompakte Gebilde mit hochgeordneter

30 ("kristalloider") Ultrastruktur beschrieben; ihre Funktion blieb jedoch für mehr als ein Jahrhundert nach ihrer Entdeckung unklar

(Behnke, H.D., Nondispersive protein bodies in sieve elements: a survey and review of their origin, distribution and taxonomic significance. IAWA Bull.12, 143-175 (1991)). Inzwischen weiß man, daß sie schlagartig beim Auftreten drastischer Änderungen des hydrostatischen Drucks im Inneren der Siebröhren

35 deformieren. Die Proteine gehen dabei vom geordneten "kristalloiden" Zustand (spindelförmig) (siehe Bezugszeichen 2 in Figur 2) in eine ultrastrukturell weniger geordnet wirkende, "disperse" Konformation über (siehe Bezugszeichen 1 in Figur 2;

in dieser Figur bezeichnet 3 eine Siebplatte und 4 die Siebelemente). Die disperse Form besitzt eine abgerundete Gestalt und bildet Pfropfen in den Siebröhren und reduziert damit den weiteren Fluß der an Photoassimilaten reichen Flüssigkeit innerhalb des Röhrensystems. Die Proteinkörper verlieren hierbei ihre interne Organisation offenbar jedoch nicht vollständig, da sie in der Lage bleiben, den geordneten "kristalloiden" Zustand spontan wiederherzustellen. Eine Arbeitsgruppe um die Erfinder konnte zeigen, daß sich die *in situ* beobachteten Konformationsänderungen durch die Abhängigkeit der Konformation kristalliner P-Proteine von bestimmten divalenten Kationen hinreichend erklären lassen (Knoblauch, M., Peters, W.S., Ehlers, K. & van Bel, A.J.E.; Reversible calcium-regulated stopcocks in legume sieve tubes. Plant Cell 13, 1221-1230 (2001)). Der "kristalloide" Zustand herrscht bei Ca^{++} -Konzentrationen von deutlich unter $1 \mu\text{M}$, wie sie mit Chelatoren eingestellt werden können, vor, während Konzentrationen im mikromolaren Bereich zur Transformation in die "disperse" Konformation führen. Im Hinblick auf die biologische Funktion der Proteinkörper wurde ihnen der Name "Forisomen" verliehen, abgeleitet von foris (lat.: Türflügel) und soma (griechisch: $\sigma\mu\mu\alpha$: Körper).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, die bisher nur *in situ* beobachteten "P-Proteine" zu isolieren, zu charakterisieren, ein reproduzierbares Verfahren für ihre Bereitstellung anzugeben und zu überprüfen, ob und ggf. für welche Verwendungszwecke sie sich eignen könnten.

Den Erfindern ist es in Lösung der gestellten Aufgabe nun erstmals gelungen, Forisomen aus Pflanzen der Familie der Leguminosen (Fabaceen) zu isolieren. Diese Isolierung hat sich als äußerst schwierig erwiesen. Zwar ist es möglich, einzelne Proteinkörper manuell aus der Zelle zu schieben und auf einen Objektträger zu übertragen; hierbei werden diese jedoch in unkontrollierbarer Weise zerstört, so daß die erhaltenen, mehr oder weniger amorphen Klumpen nur eine geringe Reaktivität zeigen, die sich in scheinbaren Volumenänderungen als Reaktion

auf Änderungen der Calcium-Konzentrationen im Medium äußert. Forisomen aus solchen Pflanzen zu gewinnen, zu isolieren und in intakter Form zu beobachten, gelang jedoch erst nach vielen fehlgeschlagenen Versuchen und Vorversuchen.

5 Erfindungsgemäß wurde schließlich festgestellt, daß es günstig ist, das als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Forisomen einzusetzende Phloem mechanisch dadurch zu gewinnen, daß
10 Längsabschnitte aus Stengeln oder dergleichen der Donorpflanze von Xylem befreit werden und anschließend das Phloem vom Cortex und vom Sklerenchym getrennt wird. Die Zellen des Phloems werden aufgeschlossen, und eine Suspension der aufgeschlossenen Zellen wird filtriert, wobei die Poren des Filtermediums vorzugsweise
15 eine Größe besitzen, die intakten Zellen den Durchtritt verwehrt. Nach Gewinnung der die Forisomen enthaltenden Fraktion aus dem Filtrat können diese mit Hilfe einer Gradientenzentrifugation von den übrigen Bestandteilen getrennt werden.

20 Zur Aufbewahrung der gewonnenen Forisomen eignet sich ein Medium wie beispielsweise 70%-ige Saccharose bzw. 70% Glycerin in V-Medium (Zusammensetzung siehe Beispiel 1) (w/v); die Lagerfähigkeit ist bei -20°C sehr hoch; bei Raumtemperatur beträgt sie etwa 3 Wochen.

25 Die so isolierten, ggf. gelagerten Forisomen sind vollständig intakt. Sie weisen als Ganzes eine ausgeprägte Reaktivität auf. Dabei hat sich gezeigt, daß der "disperse" Zustand *in vitro* ebenso gut sicht- und manipulierbar ist wie der "kristalloide"
30 Zustand. Die Änderungen der optischen Eigenschaften des Proteinkörpers beim Übergang zwischen "kristalloider" und "dispenser" Konformation stellt einen unabhängigen Beleg für die dabei auftretenden Änderungen der inneren Organisation des Proteinkörpers dar.

35 Wie nun an unbeschädigt isolierten Proteinkörpern erkennbar wurde, geht mit der "Dispersion" nicht nur eine Verdickung des Proteinkörpers in den Richtungen senkrecht zu seiner Längsachse

einher, sondern auch eine Kontraktion entlang der Längsachse (siehe Figur 1). Die Induktion dieser Konformationsänderung kann durch eine Gabe von Calciumionen induziert werden, mit der die Umgebungskonzentration an diesen Ionen von unter etwa 30nM Ca^{2+} auf vorzugsweise deutlich über diesen Wert angehoben wird (Schwellenkonzentration). Die Reaktion tritt ohne meßbare Verzögerung zeitgleich mit der Änderung der Calcium-Konzentration auf; sie ist vollständig, eine weitere Erhöhung der Calcium-Konzentration bewirkt keine Veränderung mehr. Die Verdickung ist uneingeschränkt reversibel und praktisch beliebig oft wiederholbar (experimentell wurden mindestens 50 Zyklen überprüft). Die Umkehr der Konformationsänderung wird durch eine Senkung der Calciumionen-Konzentration in der Umgebung der Forisomen auf unter 30nM bewirkt, z.B. durch Medienwechsel oder Zugabe von Chelatbildnern für das Calcium. Die Kontraktion infolge der Konformationsänderung liegt bei bis zu ca. 30%; dies ist ein bemerkenswert hoher Wert im Vergleich zu anderen aktuatorischen Proteinen. Die Konformationsänderung erfolgt im Millisekundenbereich.

Die unterschiedliche Reaktion völlig intakter "Kristalloide" im Vergleich zu den zuvor isolierten, beschädigten, amorphen Klumpen deutet an, daß die Fähigkeit zur Kontraktion eine weitgehend intakte interne Organisation voraussetzt. Dies bedeutet jedoch nicht, daß nur originäre "Kristalloide" zur Reaktion befähigt sind. Vielmehr könnten die Erfinder zeigen, daß auch Bruchstücke, die durch Zerschmettern gefrorener Proteinkörper gewonnen wurden, nach dem Auftauen in "gewohnter Weise" reagieren. Partien der "Kristalloide" reagieren also autonom, sofern nur die entsprechende innere Strukturierung gegeben ist. Erfindungsgemäß konnte festgestellt werden, daß diese Reaktivität ausgehend von intakten, in der Regel etwa 30-40µm langen und etwa 5-10µm dicken Forisomen mindestens bis zu einer Zerkleinerung in den Bereich, der lichtmikroskopisch gerade noch nachzuweisen ist, erhalten bleibt. Das heißt, daß selbst Forisomen-Bruchstücke mit Abmessungen im Bereich von etwa 1µm das beschriebene Verhalten aufweisen.

Calcium kann, ähnlich wie *in situ*, durch Barium und Strontium funktionell ersetzt werden; Magnesium bleibt auch hier ohne jede Wirkung.

5 Überraschend konnte nun festgestellt werden, daß kristalline P-Proteine *in vitro* auch auf Änderungen des pH-Wertes reagieren. Steigt der pH-Wert auf über etwa 9,5, insbesondere über pH 9,9, so stellt sich eine reversible Schwellung der Proteinkörper ein. Die Reaktion nimmt stufenweise in der Intensität bis zu einem
10 pH-Wert von 10,6 zu. Fällt der pH-Wert unter einen Wert von 9,5, verschwindet die Schwellung; es gibt keine Hysterese. Ab pH-Wert 10,9 denaturieren die Forisomen. Die durch basische pH-Werte induzierte Schwellung geht, anders als bei der Calciumionengabe, mit einer Kontraktion in Richtung der Längsachse von nur wenigen
15 Prozent einher, so daß im Endeffekt eine Volumenvergrößerung beobachtet wird. Sie unterscheidet sich daher von den durch Kationen bewirkten Konformationsänderungen. Im sauren Bereich werden die P-Proteine bei einem pH-Wert von etwa 4,5 irreversibel denaturiert.

20 Die Forisomen der vorliegenden Erfindung bestehen aus mindestens zwei unterschiedlichen Proteinen. Dies konnte anhand einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Proteinmaterials festgestellt werden, das wie oben beschrieben mit Hilfe einer
25 Gradientenzentrifugation isoliert worden war (siehe Figur 3). Die Molekulargewichte der beiden dabei aufgefundenen Proteine liegen im Bereich von ca. 55 bis 65 kDa (P1) und 53 bis 63 kDa (P2). Die genannte Polyacrylamid-Gelelektrophorese liefert weitere Proteinbanden, die weiteren Proteinen (P3 und P4)
30 zugeordnet werden können, bei denen es sich aber möglicherweise um Abbauprodukte von P1 und P2 handelt. Diese Hypothese wird durch Antikörperstudien gestützt. Eine enzymatische Verdauung der Proteine P1 und P2 liefert zwei Peptide, die über Tandem-Massenspektrometrie (CID-MS/MS) analysiert werden
35 konnten. Diese beiden Peptide haben die folgenden Strukturen:

Leu-Gln-Asp-Asn-Pro-Gln-Glu-Val-Ile-Lys (1. Peptid)
Glu-Gly-Phe-Asp-Ile-Ala-Phe-Lys (2. Peptid).

Erfindungsgemäß wurden also Forisomen oder Proteinkörper aus den Siebröhren der Leguminosen aufgefunden, die mindestens aus zwei verschiedenen Proteinen vergleichbarer Größe bestehen und
5 bereits in sehr gering dimensionierten Aggregaten oder Komplexen reversible kontraktile Eigenschaften aufweisen, welche sich zum einen durch Calciumionen oder andere, vergleichbare zweiwertige Ionen induzieren lassen, zum anderen auch durch eine Veränderung des pH-Wertes; wobei bemerkenswert ist, daß der pH-Wert-Bereich,
10 in dem die Konformationsänderung auftritt, unphysiologisch ist und daß die beiden beobachteten Konformationsänderungen unterschiedlich sind. Für die Auslösung der Konformationsänderung ist kein ATP als Energielieferant notwendig. Bezüglich der Kontraktilität in Gegenwart von
15 Calciumionen ähneln die Proteinkörper in gewisser Weise denen des Spasmins sessiler Ciliaten, dessen Kontraktion ebenfalls calciumabhängig ist. Allerdings kontrahiert Spasmin isotrop und reagiert erst bei hundertfach höheren Calcium-Konzentrationen.

20 Aufgrund der Reaktivität sehr kleiner Proteinkörper mit einem Durchmesser von nur etwa einem Mikrometer oder sogar weniger kann spekuliert werden, daß während der Ontogenese der Siebelemente anfänglich sehr kleine Proteinkörper mit einem entsprechend kleinen Durchmesser durch Anlagerung weiterer
25 Untereinheiten zu dem Komplex im Mikrometerbereich kondensierten, der sich heute auffinden läßt. Diese würde erklären, warum der Proteinkörper trotz variabler Größe in allen Stadien reaktiv ist.

30 Bioanaloge Aktuatoren sind in der Bionik im mikro- und nano-Bereich von zunehmendem Interesse. Mit ihrer mechanischen Aktivität, spezifischen Reaktivität, Langlebigkeit und offensichtlichen Ungefährlichkeit für den menschlichen Organismus (Leguminosen sind wichtige Nahrungsmittel) verfügen
35 die Proteinkörper der vorliegenden Erfindung über Eigenschaften, die für einen Mikro- bzw. Nanoaktuator besonders in der Medizintechnik gefordert werden. Gegenüber anderen kontraktile Elementen des Cytoskeletts besitzen sie den Vorteil, daß ihre

strukturelle Kohärenz nicht auf kontinuierlichem Auf- und Abbau beruht. Andere Motorproteine des Cytoskeletts unterliegen nämlich einem ständigen Turnover, was in der Regel ihre Haltbarkeit *in vitro* stark begrenzt.

Die Erfinder konnten zeigen, daß sich die Kontraktion der erfindungsgemäßen Forisomen quantifizierbar in Krafterzeugung umsetzen läßt. Die Tatsache, daß auf Glas- oder anderen Oberflächen gepresste Forisomen an diesen anhaften, ermöglicht z.B. die Fixierung individueller Exemplare zwischen zwei Federarmen, z.B. aus Glasfasern. Die Hafteigenschaften der Forisomen an den Federarmen können durch eine geeignete Beschichtung des Materials der Federarme, z.B. mit poly-L-Lysin oder Klebstoffen wie z.B. Kwik-Sil (Handelsmarke der World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), ggf. verbessert werden. Wird durch eine Gabe von Calciumionen die Kontraktion ausgelöst, so entwickelt jeder einzelne Proteinkörper eine so große mechanische Kraft, daß die Federarme erheblich verbogen werden. Eine solche Anordnung ist daher als Mikropinzette geeignet, mit der sich organische oder anorganische Strukturen wie Zellen, Gewebe oder Molekülkörper manipulieren oder positionieren lassen. In Figur 4 ist eine solche Pinzette schematisch dargestellt: 4A bezeichnet den offenen Zustand mit relaxiertem Forisom, 4B bezeichnet den geschlossenen Zustand mit kontrahiertem Forisom. Die Bewegung der Pinzette kann manuell unter dem Lichtmikroskop oder elektronisch gesteuert werden. Da die Größe funktionsfähiger Forisomen im Bereich von 1µm (oder sogar darunter) bis 40µm liegt, kann die Spannweite der Pinzettenspitze in einem entsprechenden Bereich eingestellt werden. Mit einer solchen Pinzette können kleinste Körper oder Substanzmengen zielgenau transportiert und zur Reaktion und biologische Prozesse ortsgenau zum Ablauf gebracht werden. Alternativ lassen sich Forisomen beispielsweise als Sensorelemente für einen pH-Wert-Umschlag im Bereich bei etwa 9,5 bis 10 und für die Erhöhung der Calciumionen in einem Medium von unter auf über 30 nM oder umgekehrt verwenden, die gleichzeitig als Anzeigenelemente nutzbar sind: Forisomen können so zwischen zwei Federarmen angeordnet werden, dass ihre

Kontraktion unter den genannten Umgebungsänderungen einen Kontakt der Spitzen dieser Federarme bewirkt. Wenn die Spitzen elektrisch leitend sind und über die Federarme beim Kontakt der Spitzen ein Stromkreis geschlossen wird, kann die Änderung der Wasserstoff- bzw. Calciumionen-Konzentration im Medium, z.B. in einem enzymatischen Verfahren, unmittelbar detektiert werden. Ein derartiges Element ist schematisch in Figur 5 gezeigt: 5A bezeichnet den offenen Schaltkreis mit relaxiertem Forisom, 5B den geschlossenen Schaltkreis mit kontrahiertem Forisom.

Nachstehend soll die Erfindung anhand von Beispielen und Vor- und Vergleichsbeispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

Aufreinigung von Forisomen aus *Vicia faba*:

Vorbemerkung: *Vicia faba* L. cv Witkiem major (Nunhem Zadenh BV, Haalen, The Netherlands) oder andere *Vicia faba*-Sorten lassen sich problemlos im Gewächshaus züchten.

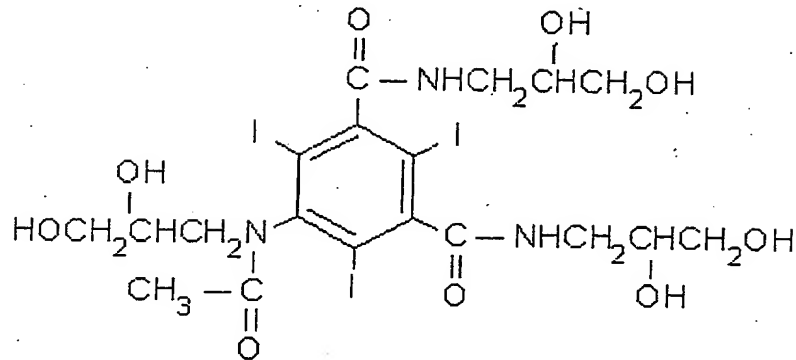
1. Abtrennen der Wurzel vom Sproß am Hypokotyl: Die Sproßachsen 7-8 Wochen alter *Vicia faba*-Pflanzen wurden kurz oberhalb der Bodenlinie mit einer Rasierklinge abgetrennt; anschließend alle Blätter entfernt und 10 cm der Sproßspitze abgeschnitten.
2. Trennen des Cortex inklusive Phloem vom Xylemcyylinder: Methode zur Trennung des Phloem vom Rest der Sproßachse (die intakte Sproßachse ist in Figur 6A gezeigt): Als effektivste Technik erwiesen sich zwei gegenüberliegende Schnitte entlang der Längsachse der Pflanze, die die Rinde bis zum Xylem der Leitgewebe, die hier ringförmig angeordnet sind, durchtrennten (sh. Figur 6B). Anschließend wurde die Rinde entlang des Xylems vorsichtig abgezogen (Figur 6C). Dabei konnte beobachtet werden, daß das Phloem auf der Innenseite der abgezogenen Rinde haften blieb und sich somit sauber vom Xylem trennen ließ. Besonderes Augenmerk mußte auf die

Bereiche um die Nodien gerichtet werden, da hier die Leitgewebe abzweigen und somit an diesen Stellen eine saubere Trennung schwer zu erreichen ist. Anschließend konnte der innere Xylemzylinder verworfen werden. Vicia-Pflanzen, bei denen das sekundäre Dickenwachstum noch nicht eingesetzt hatte, zeigten eine ringförmige Verteilung von Sklerenchymfasern im Cortex, denen das Phloem aufgelagert war. Aufgrund der Festigkeit dieser Fasern konnten sie leicht mit Hilfe einer Pinzette vom Cortex abgezogen werden (Figur 6D), wobei das Phloem an ihnen haften blieb.

3. Einlegen des Cortex in V-Medium (10 mM EDTA, 10 mM Tris, 100 mM KCl pH 7.3): Eine vorangestellte einstündige Inkubation in V-Medium erleichtert die Trennung von Phloem und Sklerenchym (Schritt 4) und ermöglicht zudem den Forisomen eine Regeneration in die kristalline Form.
4. Trennen des Phloems vom Sklerenchym und Cortex: Das Phloem wird nach Ablauf der Inkubationszeit mit Hilfe eines stumpfen Skalpells von der Innenfläche der Rinde abgetragen.
5. Mörsern des Phloems unter flüssigem Stickstoff (vorteilhaft ist zwischenzeitliches Sieben, um bereits freigesetzte Forisomen vor Zerstörung zu schützen): Das Phloem wurde mit Zellstoff trockengetupft und unter flüssigem Stickstoff etwa 10 Minuten bis zum Erreichen eines pulvrigen Zustandes gemörsert und in V-Medium aufgenommen. Die Suspension wurde danach durch ein Gewebesieb gegossen und der zurückbleibende Überstand mehrmals mit 5 ml V-Medium gründlich durchgespült. Die Porengrößen des Gewebesiebs wurden variiert und dabei die Größen 100 μm , 80 μm und 59 μm getestet. Die Porengröße von 59 μm erwies sich als optimal, da die Forisomen mit einer Länge von ungefähr 30 μm problemlos durchfallen konnten, auch wenn sie noch mit anderem feinkörnigem Material zusammenhafteten. Darüber hinaus verwehrt diese Porengröße unaufgeschlossenen Zellen die Passage.

6. Das Filtrat aus Schritt 5. mit den darin enthaltenen Forisomen wurde bei 5000 x g und 4°C 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
- 5 7. Das bei der Zentrifugation entstandene Pellet wurde in 5 ml V-Medium rückgelöst und auf einen Nycodenz Gradienten (80 - 20 % in V-Medium) aufgetragen: Zur Vorbereitung der Gradientenzentrifugation wurde mittels eines Gradientengießers ein kontinuierlicher Gradient gegossen. Zu
10 diesem Zweck wurde eine Säule mit 15 ml 80%iger Nycodenzlösung befüllt, während die andere Säule mit 3,75 ml 80%iger Nycodenzlösung und mit 11,25 ml Pflanzensuspension befüllt wurde - entsprechend einer 20%igen Nycodenzlösung. Mit Hilfe des Gradientengießers konnte nun ein Gradient von 80% am Boden bis 20% am oberen Rand des Zentrifugenröhrchens erreicht werden.
- 15 8. Der Nycodenzgradient gemäß Schritt 7 wurde 3h bei 150000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Mit Hilfe dieser
20 Zentrifugation erhielt man ein Bandenmuster wie in Figur 7A zu sehen: Mit der Bezugsziffer 1 ist eine Bande aus Chloroplasten als oberste Schicht zu sehen. Im mittleren Bereich befindet sich beim Bezugszeichen 2 eine breite, relativ scharf abgesetzte Bande, die hauptsächlich aus
25 Membranresten besteht. Am Boden des Zentrifugenröhrchens, mit 4 bezeichnet, befindet sich ein Pellet aus Zellwandtrümmern. Etwa im oberen Drittel der Phase zwischen Membranbande und Zellwand-Pellet kann eine dünne Bande identifiziert werden, die ausschließlich aus Forisomen besteht (in Figur 7A mit
30 Bezugsziffer 3 bezeichnet).
9. Die abgenommene Fraktion (forisomenhaltig) wurde mit einem doppelten Flüssigkeitsvolumen versetzt und bei 5000 x g 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
- 35 10. Zur Aufbewahrung werden die Forisomen mit 70% Saccharose in V-Medium (w/v) bei minus 20°C eingefroren.

Nycodenz besitzt die folgende Formel:



Die Verbindung findet Verwendung als nichtionisches Dichtegradientenmedium.

Literatur: Rickwood, D., et al., Anal. Biochem. 123, 23 (1982)
Beilstein Registry Number: 2406632

Vertrieb: Nycomed Pharma AS, Norwegen.

Synonym Histodenz (Sigma-Aldrich)

15 Beispiel 1A:

Beispiel 1 wurde mit gleichaltrigen *Vicia*-Pflanzen wiederholt, deren sekundäres Dickenwachstum bereits eingesetzt hatte. Die Trennung des Cortex und Phloem vom Xylemzylinder erfolgt hier folgendermaßen:

Bei diesen Pflanzen schloß sich das Phloem durch die Bildung eines interfascikulären Cambiums zu einem Zylinder. Die Sklerenchymfasern waren ebenfalls stärker ausgeprägt, so daß nach Trennung des Cortex vom Xylem ein Abziehen der Sklerenchymfasern mit Hilfe einer Pinzette nur schwer durchzuführen und mit einem hohen Verlust an Phloem verbunden war. Bei diesen Pflanzen erwies es sich als wesentlich effektiver, das Phloem nach Ablauf der Inkubationszeit mit Hilfe

eines stumpfen Skalpell von der Innenfläche der Rinde abzutragen. Dies hat den Vorteil, auch die Sklerenchymfasern abtrennen zu können. Außerdem ist die Ausbeute an Phloem deutlich höher als bei den *Vicia*-Pflanzen ohne sekundäres Dickenwachstum.

Beispiel 1B:

Beispiel 1 wurde wiederholt, wobei die Gradientenzentrifugation gemäß den Schritten 7 und 8 mit einer Pflanzensuspension erfolgte, der vor dem Gießen des Gradienten 0,1% Triton X100 zugegeben worden war, um Membran- und Zellwandproteine herauszulösen und möglicherweise entstehende Wechselwirkungen zwischen Forisomen mit Membranresten herabzusetzen. Nach Zentrifugation unter denselben Bedingungen erhielt man dabei eine Bandenverteilung gemäß Figur 7B: Zwar konnte hier keine Chloroplastenbande mehr beobachtet werden, allerdings befanden sich die Forisomen trotz der Behandlung mit Triton zu einem überwiegenden Teil in der Membranbande (1).

Beispiel 2:

Auftrennung der Forisomen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

1. Die Forisomen wurden in V-Medium für 10 min. bei 5000 x g zentrifugiert.
2. Der Überstand wurde verworfen, und die Forisomen wurden in 250 µl 50mM Tris-HCl Puffer pH 6,8 aufgenommen.
3. Die Forisomenlösung wurde mit 200 µl 10 % Natrium-dodecylsulfat-Lösung, 25 µl 60 % Saccharose-Lösung und 2,5 µl 2-Mercaptoethanol versetzt und 5 min. bei 95 °C denaturiert.
4. Die Mischung wurde 5 min. bei 12000 x g zentrifugiert.

5. Die denaturierten Proteine wurden mit Hilfe eines 10 % SDS-Polyacrylamidgels nach Laemmli (1970) elektrophoretisch aufgetrennt.
6. Die Proteine wurden im Anschluss durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Figur 3 zeigt das Gel mit den aufgetrennten Forisomenbestandteilen. Das Molekulargewicht ist in KDa angegeben.

Beispiel 3:

Bestimmung der Peptidsequenzen mittels Massenspektrometrie

1. Enzymatischer Verdau mit Trypsin

Die Proteinbanden der SDS-PAGE gemäß Beispiel 2 werden aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nachdem die Gelstückchen mit Acetonitril dehydriert wurden, wird das Acetonitril entfernt. Anschließend werden die Gelstückchen in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Darauf wird 10 mM Dithiotreitol (DTT) in 100 mM NH_4HCO_3 dazugegeben, bis alle Gelstückchen mit der Lösung vollständig bedeckt sind. Die Proteine werden nun 1 h bei 56 °C reduziert. Nach Kühlung auf Raumtemperatur wird die DTT Lösung durch dasselbe Volumen von 55 mM Iodoacetamide in 100 mM NH_4HCO_3 ersetzt. Nach 45 min. Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit werden die Gelstückchen mit 50-100 μL 100 mM NH_4HCO_3 10 min lang gewaschen, mit Acetonitril getrocknet, mit 100 mM NH_4HCO_3 rehydriert und wiederum mit demselben Volumen an Acetonitril getrocknet. Die flüssige Phase wird entfernt und die Gelstückchen werden in einer Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet. Daraufhin werden die Gelstückchen mit dem "Verdaupuffer" (50 mM NH_4HCO_3 , 5 mM CaCl_2 und 12.5 ng/ μL) Trypsin) bei 0°C versetzt. Nach 45 min. werden die Überstände entfernt und durch 5-10 μL eines Puffers, bestehend aus 50 mM NH_4HCO_3 und 5 mM CaCl_2 ersetzt, um die Gelstückchen während des Verdaus für 12 h bei 37°C feucht zu halten. Schließlich werden die entstandenen Peptide durch

Extraktion mit 20 mM NH_4HCO_3 und dreimaliger Extraktion mit einer Mischung aus 5% Ameisensäure 45 entsalztem Wasser und 50% Acetonitril (je 20 min) bei Raumtemperatur und die gesammelten Extrakte in einer Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet.

2. Entsalzung der Proben

Die Probe wird in 10 μl 1 % TFA aufgenommen und anschliessend mit ZipTipsTM (ZipTipsTM ist ein eingetragenes Warenzeichen der Millipore Corporation, Bedford, MA oder einer Tochtergesellschaft) entsalzt.

Zuerst erfolgt die Äquilibrierung der Spitze mit 10 μL einer Mischung von 50% Wasser (HPLC grade) und 50% Acetonitril (HPLC grade) und anschließender Abgabe. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Die Spitze wird darauf mit 10 μl 0,1% iger Trifluoressigsäurelösung befeuchtet, indem man zweimal diese Lösung einsaugt und wieder abgibt.

Die Peptidmischung aus dem Verdau mit Trypsin wird nun vollständig eingesaugt und wieder abgegeben. Dieser Vorgang wird 9mal wiederholt.

Die gebundenen Peptide werden durch 10maliges Waschen mit 0,1% Trifluoressigsäurelösung vom Salz befreit. Schließlich werden die Peptide mit 3-10 μl einer Mischung aus 0,1 %iger Ameisensäure, 39,9 % Wasser (HPLC grade) und 60% Acetonitril (HPLC grade) eluiert. Das Eluat wird je 4 mal wiederum eingesaugt und abgegeben.

3 μl des Eluats werden in eine Nanospray-Glaskapillare gefüllt. Die Glaskapillare wird in den dafür vorgesehenen Halter befestigt und der Halter in die Nanospray-Ionenquelle überführt.

Die Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgt für ein Massenspektrum mit einer Peptidmischung (je 1 $\mu\text{mol/l}$

Angiotensin I, Substance P, GluFibrinopeptide, Renin Substrate, ACTH Clip 18-39 und Rinder-Insulin) und für den MS/MS-Modus mit dem Peptid GluFibrinopeptide (100 nmol/l).

5 3. Aufnahme der Massenspektren bzw. CID-MS/MS Spektren

Alle Massenspektren und MS/MS werden mit einem Q-TOF-2™ der Firma Micromass aufgenommen. Für die Ansteuerung des Massenspektrometers und der Datenprozessierung wird die
10 Software Masslynx 3.5™ und ProteinLynx 1.0™ verwendet.

Die Kapillarspannung beträgt zwischen 1,0-1,5 kV, die Cone Spannung wird im Massenbereich m/z 400-2500 von 20 eV-100 eV variiert.

15 Der Argon-Druck in der Kollisionszelle beträgt bei CID-MS/MS (5+1) 10⁻⁶ mbar. Die Aufnahmezeit beträgt pro Scan 2,4 sec. mit einem Zeitraum von 0,1 sec. zwischen jedem scan.

20 Für die De Novo Sequenzierung werden alle gebildeten Peptid-Ionen von dem enzymatisch verdauten Proteins einzeln und vollautomatisiert mit Hilfe der "Collision-Induced
Dissociation" (CID) selektiert und fragmentiert (CID-MS/MS). Dabei werden ausschließlich 2, 3 und 4 fach protonierte
25 Spezies selektiert. Aus dem gewonnenen MS/MS-Spektrensatz werden Sequenz-Informationen der entsprechenden Peptide softwaregestützt ermittelt. Diese Sequenz-informationen werden für eine "Blast"-Suche in der Mascot Datenbank
30 verglichen, um homologe Proteine zu finden. Alle MS/MS Spektren und die daraus resultierenden Aminosäuresequenzen der entsprechenden Peptide werden evaluiert.

Beispiel 4:

35 Induktion der Kontraktion von Forisomen durch Calciumionengabe.

Isolierte Forisomen werden in eine 1 mL fassende Versuchskammer übertragen. Dabei wird jeweils ein isoliertes Forisom mit Hilfe einer Mikroinjektionsnadel an einem Ende an den Kammerboden gepresst, um ein Verdriften beim Durchspülen der Kammer zu verhindern. Anschließend werden mit Hilfe einer automatischen Durchflußvorrichtung wechselweise V-Medium (10 mM EDTA, 10 mM TRIS pH 7,3, 100 mM KCl) und Ca-Medium (10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 100 mM KCl) auf das Forisom aufgebracht, was jeweils zu einer Konformationsänderung führt. Die Konformationsänderung kann mikroskopisch mittels einer Kamera beobachtet werden, die auf dem Beobachtungsmikroskop aufgebracht ist. In Figur 1 sind die beiden Konformationen gezeigt, die das Forisom unter V-Medium, also im relaxierten Zustand (Figur 1A) und unter Ca-Medium, also im kontrahierten Zustand (Figur 1B) annimmt. Das Mikroskop befand sich bei den Aufnahmen im Durchlicht-Interferenzkontrast-Modus. Die Breite der Abteilungen entspricht jeweils 30 μm .

Beispiel 5:

Induktion der Volumenvergrößerung von Forisomen durch Erhöhung des pH-Wertes.

Ein isoliertes Forisom wird in eine 1 ml fassende Probenkammer eingebracht, in der sich V-Medium befindet. Dabei wird jeweils ein isoliertes Forisom mit Hilfe einer Mikroinjektionsnadel an einem Ende an den Kammerboden gepresst, um ein Verdriften beim Durchspülen der Kammer zu verhindern. Anschließend wird, ausgehend von pH 7,3, der pH-Wert mit Hilfe einer automatischen Durchflußvorrichtung in Stufen von 0,3 Einheiten erhöht, wobei das verwendete Medium calciumfrei bleibt. Eine erste Reaktion des Forisoms kann bei einem pH-Wert von 9,4 festgestellt werden. Die Intensität der Reaktion steigert sich mit zunehmendem pH-Wert bis zu pH 10,6. Die Reaktion ist jeweils nach Gaben von V-Medium pH 7 vollständig reversibel. Ab und über einem pH-Wert von 10,9 denaturiert das Forisom.

Werden anstelle von EDTA/TRIS andere Puffermedien verwendet, die gegenüber Calciumionen chelatisierende Eigenschaften besitzen, wird derselbe Reaktionsverlauf beobachtet.

Im sauren Bereich verändert sich die Struktur des Forisom beim Erreichen eines pH-Wertes von 4,9. Allerdings kann man keine schrittweise erfolgende Steigerung der Reaktion beobachten. Bereits bei einem pH-Wert von 4,6 ist das Forisom irreversibel denaturiert.

Die Konformationsänderung können mikroskopisch mittels einer Kamera beobachtet werden, die auf dem Beobachtungsmikroskop aufgebracht ist.

Beispiel 6:

Herstellung einer Mikro- oder Nanopinzette zur Manipulation individueller Zellen oder Moleküle

In Figur 8 ist eine Pinzettenanordnung gezeigt, in der zwei Federarme (z.B. Glasfasern oder -mikropipetten) in einem der Länge des Forisoms entsprechenden Abstand auf einem Träger positioniert und befestigt sind (z.B. durch einen Kleber). Dabei kann das Forisom beispielsweise an den Enden mit den Spitzen der Federarme durchstossen werden (siehe Figur 9A). Im Falle von Glasfederarmen werden dabei die natürlich beim Produktionsprozess entstehenden Spitzen genutzt. Bei anderen Materialien können Spitzen z.B. durch Ätzung hergestellt werden. Die Pinzette wird dann so in die Nähe des zu greifenden Objektes gebracht, dass dieses in der Nähe des Forisoms zwischen den Federarmen zu liegen kommt (siehe Figur 9A). Alternativ kann das Forisom durch Adhäsion an einer zentralen Stelle an den Federarmen befestigt werden, wobei die Federarme adhäsionssteigernd beschichtet sein können, sofern die Adhäsion des Federarms am Forisom nicht ausreichend ist. So können Glasoberflächen beispielsweise mit Poly-L-Lysin oder vergleichbaren Materialien beschichtet

sein. Durch die zentrale Positionierung des Forisoms wird bei dieser Methode ein höherer Federweg der Arme erreicht (siehe Figur 10A).

5 Je nach Material der Federarme ist wegen unterschiedlicher Federkonstanten deren Durchmesser, deren Länge oder die Position und/oder Größe des Forisoms anzupassen. In diesem Beispiel wurden die Federarme aus Borosilikatglas mit einem Durchmesser von ca. 1-2µm und einer Länge von ca. 100-500µm
10 verwendet.

15 Die Ansteuerung des Forisoms kann je nach Anwendung auf verschiedene Art erfolgen. Durch Zugabe von freiem Ca^{++} zur Lösung oder durch pH-Wert-Änderung wird eine Kontraktion bzw. eine Volumenvergrößerung ausgelöst. Als Medien hierfür eignen sich beispielsweise die unter den Beispielen 4 und 5 genannten. Die Kontraktion durch Ca^{++} -Zugabe bewirkt ein Schließen der Pinzette, wie in den Figuren 9B und 10B
20 gezeigt.

Beispiel 7:

25 Mikro- oder Nanoschalter zur Detektion von pH-Wert- und Calciumionen-Konzentrationsänderungen in einem Medium.

30 In ähnlicher Weise wie in Beispiel 6 für Pinzetten gezeigt können Mikro- oder Nanoschalter gebaut werden, die sich als Sensoren für die Anzeige einer pH-Wert-Änderung oder einer Änderung der Calciumionen-Konzentration in dem Bereich eignen, in dem die reversible Konformationsänderung der Forisomen erfolgt. Hierfür werden die Federarme aus entsprechenden Metallen, mit einem leitfähigen Material beschichtetem Glas oder dergleichen hergestellt, oder es werden Elektroden an die Spitzen angebracht (siehe Figur
35 11A). Durch die Konformationsänderung des Forisoms bei einer entsprechenden Veränderung des pH-Wertes bzw. der Calciumionen-Konzentration im das Forisom umgebenden Medium werden die Kontakte zusammengeführt (bzw. geöffnet), und es

kommt zu einer deutlichen Abnahme (bzw. Zunahme) des Widerstandes im Stromkreis, der seinerseits mit herkömmlichen Mitteln als Schaltvorgang detektiert und ausgekoppelt werden kann (siehe Figur 11B). Als Kontakte kommen idealerweise
5 Silberelektroden oder Kupferelektroden (je nach Lösung) zum Einsatz. Für spezielle Einsatzfelder sind jedoch auch Kontakte aus anderen Materialien möglich.

10

* * *

Ansprüche:

1. Proteinkörper (Forisom), gekennzeichnet durch:

- seine Herstellbarkeit aus Fabaceen
- eine reversible, anisotrope Kontraktibilität mit der Fähigkeit, bei einer Erhöhung der umgebenden Calciumionen-Konzentration über einen Schwellenwert von ca. 30nM in den Richtungen senkrecht zur Längsachse dicker und entlang der Längsachse kürzer zu werden und umgekehrt, und der Fähigkeit, bei einer Erhöhung des umgebenden pH-Wertes auf über etwa 9,5 senkrecht zur Längsachse dicker zu werden, ohne daß er sich entlang der Längsachse entsprechend verkürzt, und umgekehrt.

2. Proteinkörper (Forisom) nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine Länge von etwa 1µm bis zu etwa 40µm und senkrecht hierzu mit einem Durchmesser von etwa 1µm bis zu etwa 10µm.

3. Proteinkörper (Forisom) nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß er aus mindestens 2 unterschiedlichen Proteinen besteht oder diese enthält.

4. Proteinkörper (Forisom) nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich aus den Proteinen bei tryptischer Verdauung die folgenden Peptide nachweisen lassen:

Leu-Gln-Asp-Asn-Pro-Gln-Glu-Val-Ile-Lys
Glu-Gly-Phe-Asp-Ile-Ala-Phe-Lys.

5. Proteinkörper (Forisom) nach einem der voranstehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch eine Kontraktibilität entlang der Längsachse von bis zu etwa 30% bei gleichzeitiger Expansion senkrecht dazu um circa 100 %.

6. Peptid oder Protein, enthaltend die oder bestehend aus der folgenden Sequenz (von N-terminal nach C-terminal gelesen):

Leu-Gln-Asp-Asn-Pro-Gln-Glu-Val-Ile-Lys.

7. Peptid oder Protein, enthaltend die oder bestehend aus der folgenden Sequenz (von N-terminal nach C-terminal gelesen):

5 Glu-Gly-Phe-Asp-Ile-Ala-Phe-Lys.

8. Verfahren zum Isolieren von Proteinkörpern (Forisomen) nach einem der voranstehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- 10 (a) Gewinnung des Phloems einer Pflanze aus der Familie der Fabaceen;
(b) Aufschließen der Zellen des Phloems;
(c) Filtrieren einer Suspension der aufgeschlossenen Zellen;
15 (d) Abtrennen der Forisomen von den übrigen Bestandteilen der Suspension mit Hilfe einer Gradientenzentrifugation.

- 20 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Gradientenzentrifugation mit einer Nycodenzlösung erfolgt, wobei das Medium der Suspension gemäß Schritt (c) KCl in einem geeigneten Puffer enthält.

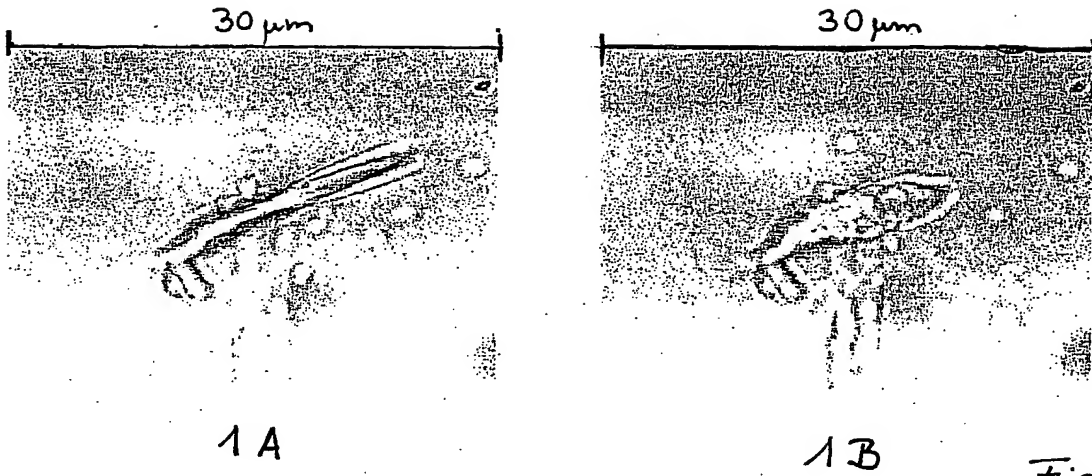
- 25 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze aus der Familie der Fabaceen *Vicia faba* ist.

- 30 11. Verwendung einer oder mehrerer Proteinkörper (Forisomen) nach einem der Ansprüche 1 bis 6 als kontraktive(s) Element(e) in einer Mikro-Pinzette oder in einem Detektionselement für pH-Wert-Änderungen oder Änderungen der Calciumionen-Konzentration.

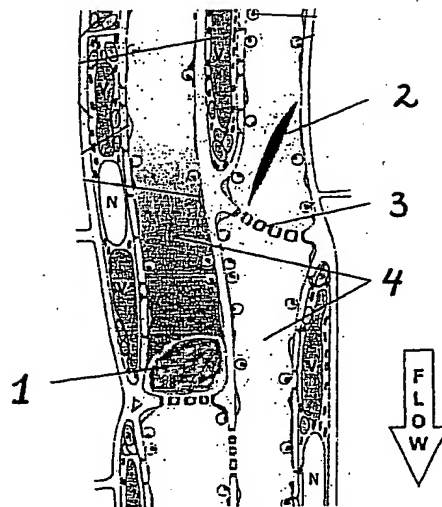
- 35 12. Verfahren zum Betreiben einer Mikropinzette, dadurch gekennzeichnet, dass ein Forisom geeigneter Größe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 stabil zwischen zwei Federarmen angeordnet wird und anschließend die Konzentration an Calciumionen in der Umgebung des Forisoms von deutlich unter 30nM auf deutlich über 30nM erhöht wird.

13. Verfahren zum Betreiben eines Anzeigeelementes für eine
Veränderung der Calciumionen von deutlich unter 30 nm auf
deutlich über 30 nm oder für eine Veränderung des pH-Wertes
von unter pH 9,4 auf über pH 10,0 in einem Medium, dadurch
gekennzeichnet, dass ein Forisom geeigneter Größe gemäß einem
der Ansprüche 1 bis 6 stabil zwischen zwei Federarmen
angeordnet wird, deren Spitzen sich bei einer Kontraktion des
Forisoms berühren können, wobei die Federarme und ihre
Spitzen so ausgestaltet sind, dass bei der genannten
Berührung ein Stromkreis geschlossen wird und Strom fließt,
wobei der Stromfluss oder die Unterbrechung des Stromkreises
als Signal dafür detektiert wird, dass die Calciumionen-
Konzentration auf deutlich über 30 nm steigt oder umgekehrt
bzw. der pH-Wert auf über pH 10,0 steigt oder unter 9,4
fällt.

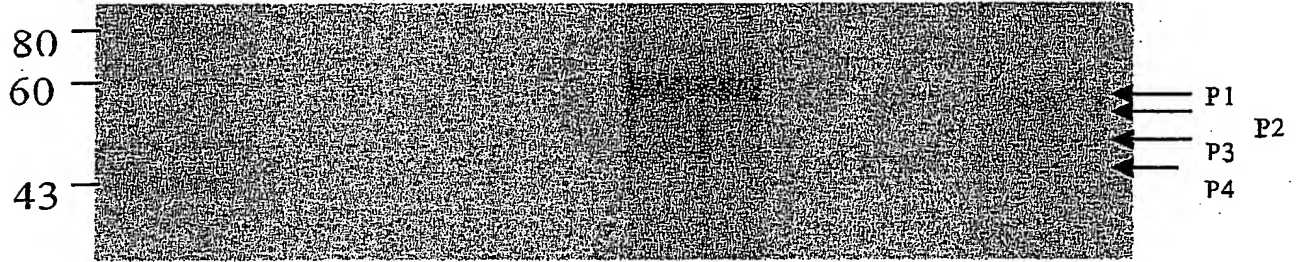
* * *



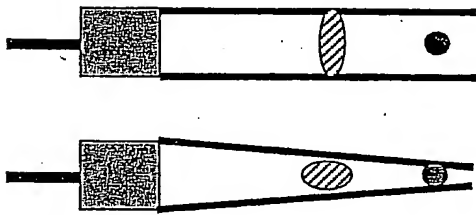
Figur 1



Figur 2



Figur 3



4A

4B

Figur 4



5A



5B

Figur 5

3/7

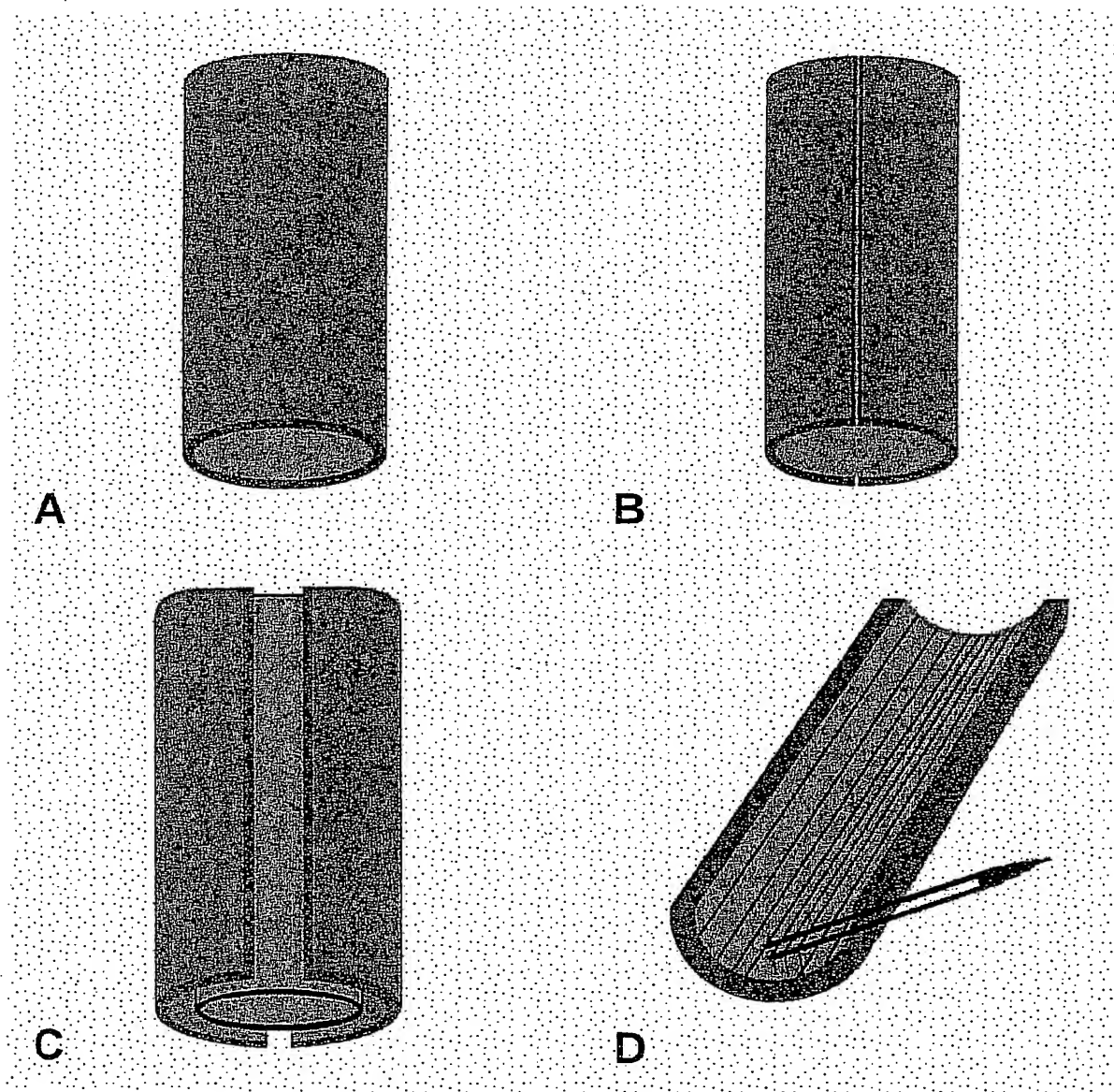
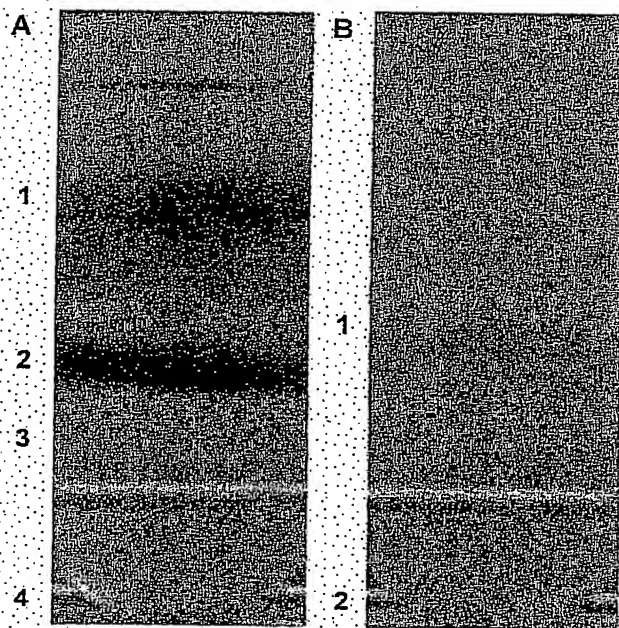


Figure 6

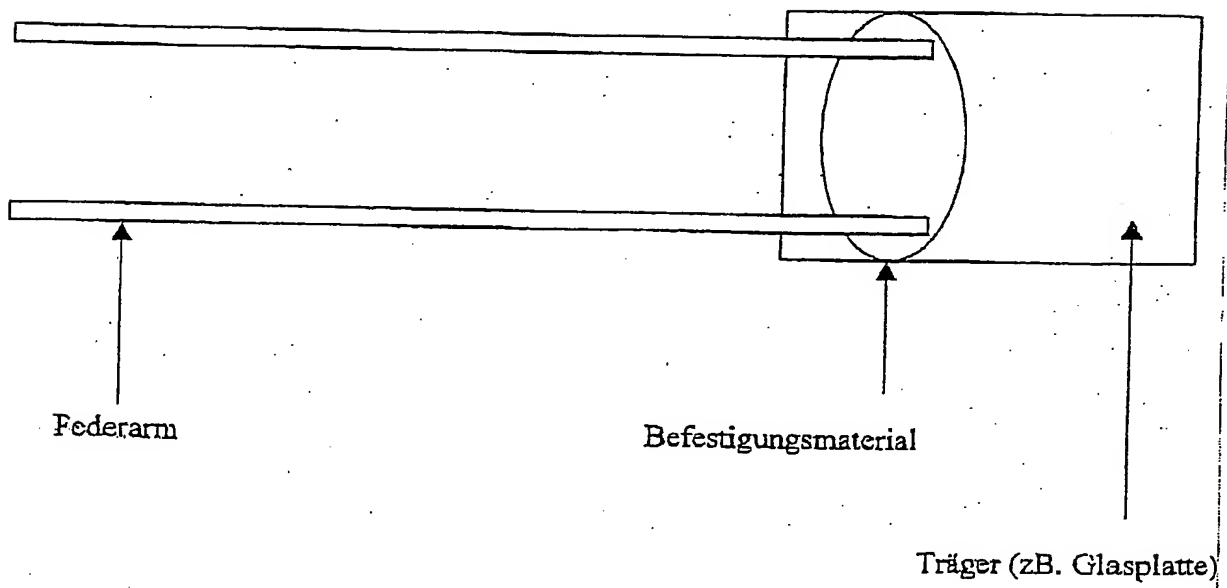
4/7



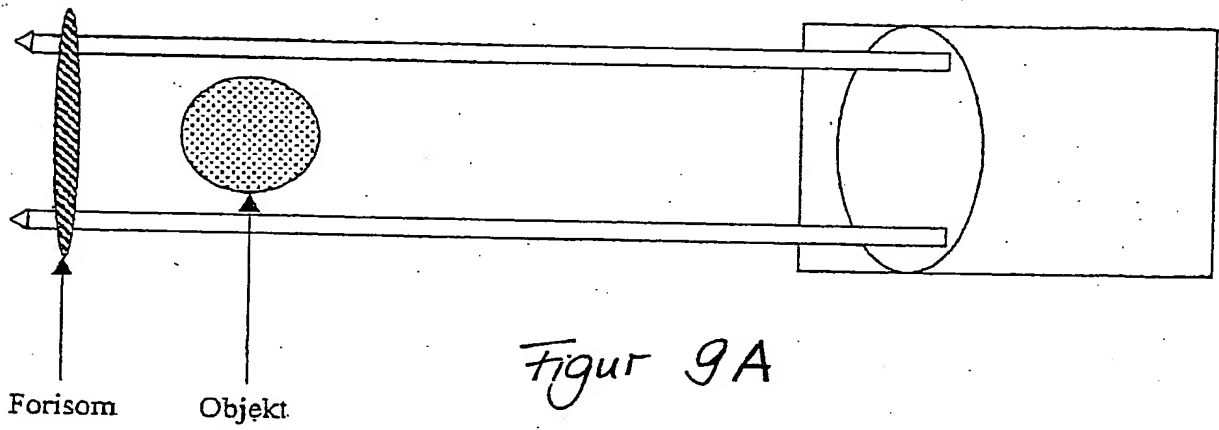
7A

7B

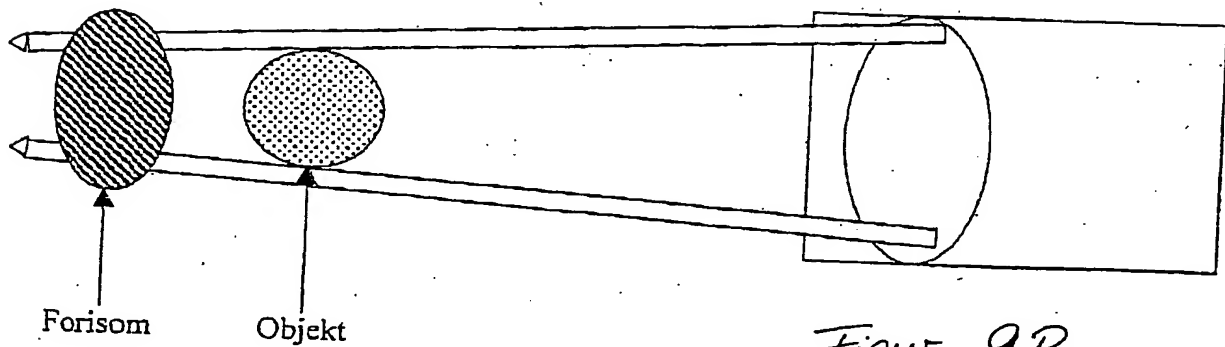
Figure 7



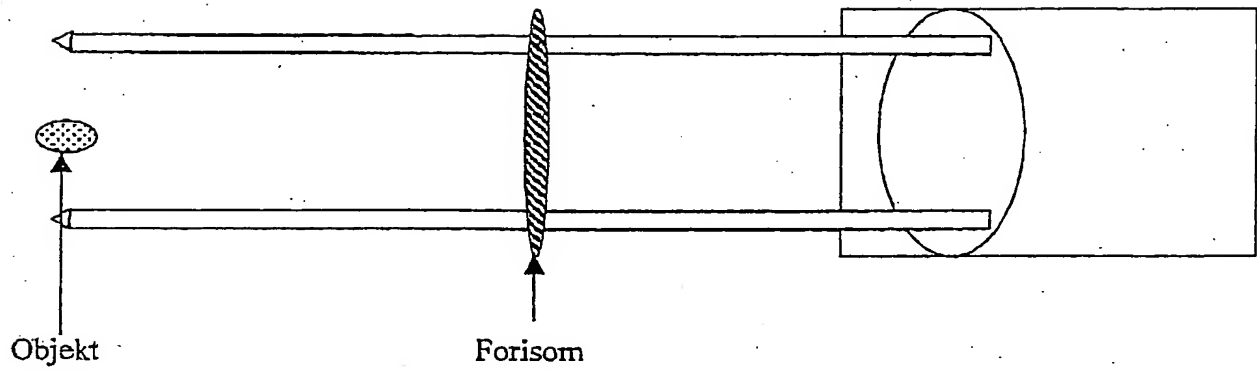
Figur 8



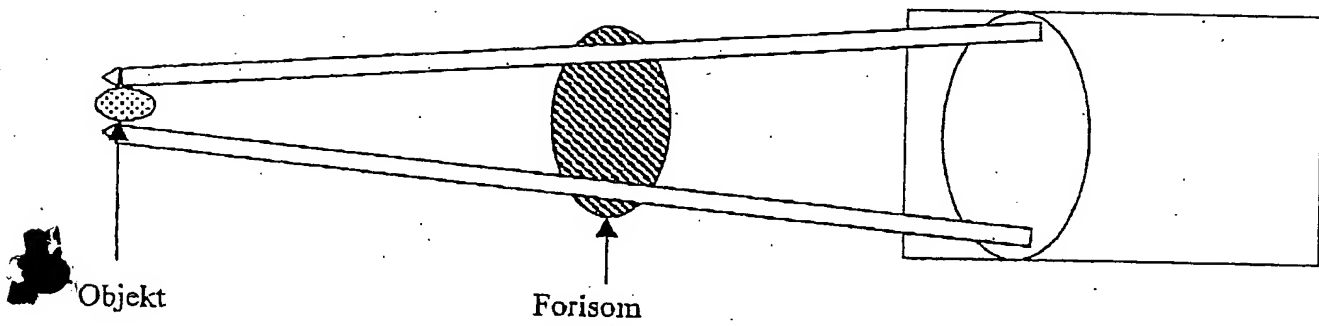
Figur 9A



Figur 9B

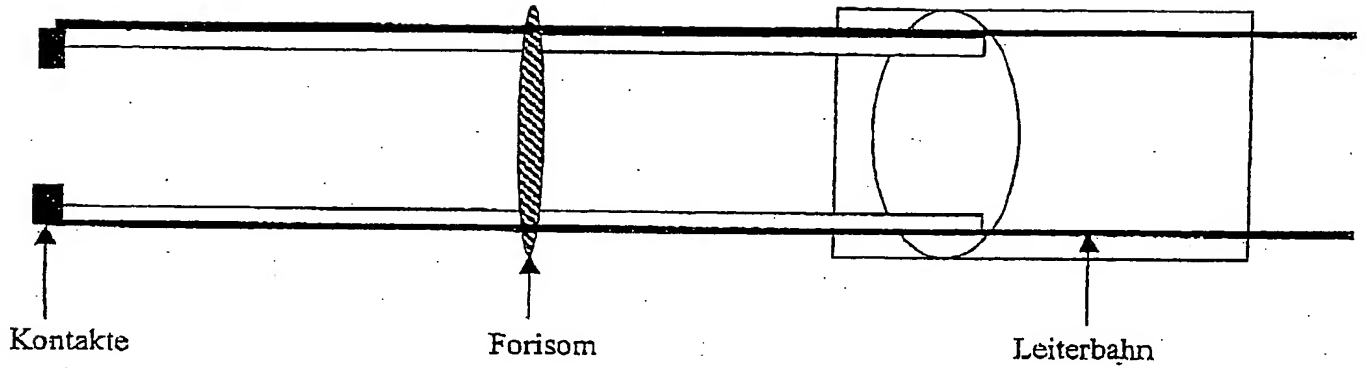


Figur 10 A

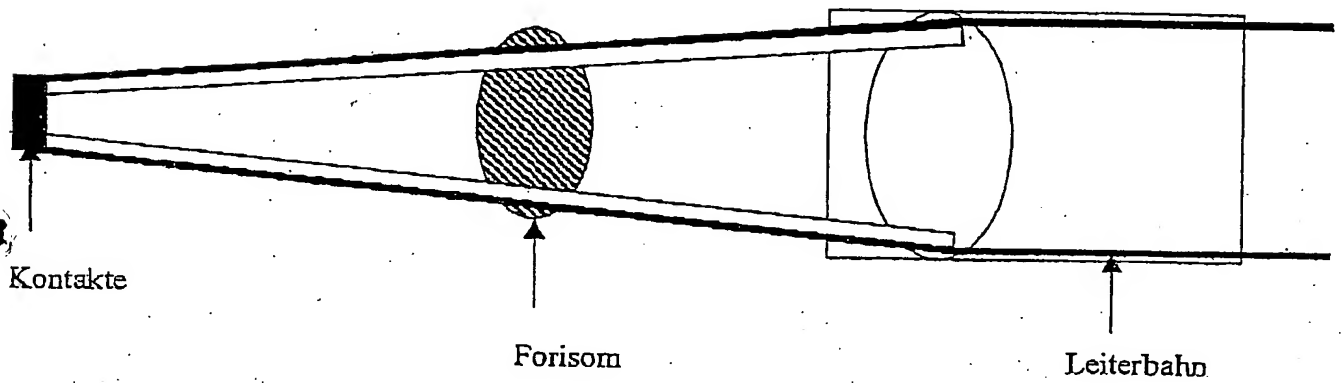


Figur 10 B

7/7



Figur 11 A



Figur 11 B

Forisomen, Verfahren zu ihrer Isolierung und ihre Verwendung als molekulare Arbeitsmaschine

Die Erfindung betrifft Proteinkörper (Forisomen), gekennzeichnet
5 durch ihre Herstellbarkeit aus Fabaceen und eine reversible,
anisotrope Kontraktibilität mit der Fähigkeit, bei einer
Erhöhung der umgebenden Calciumionen-Konzentration über einen
Schwellenwert von ca. 30nM in den Richtungen senkrecht zur
Längsachse dicker und entlang der Längsachse kürzer zu werden
10 und umgekehrt, und der Fähigkeit, bei einer Erhöhung des
umgebenden pH-Wertes auf über etwa 9,5 senkrecht zur Längsachse
dicker zu werden, ohne daß er sich entlang der Längsachse
nennenswert verkürzt. Die Erfindung betrifft weiterhin ein
Verfahren zur Isolierung dieser Forisomen sowie ihre Verwendung
15 als Pinzette oder Anzeigeelement für Calciumionen-
Konzentrations- oder pH-Wert-Änderungen unter Ausnutzung ihrer
aktuatorischen Eigenschaften.

20 Figur 1.

* * *

